

Выявление токсического воздействия тяжёлых металлов на фитопланктон с помощью нейросетевого анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла

© 2021. С. С. Хрущев¹, к. б. н., с. н. с.,
 Т. В. Дрозденко², к. б. н., доцент, с. н. с.,
 Т. Ю. Плюснина¹, к. ф.-м. н., доцент, И. В. Тимофеев², студент,
 Д. А. Тодоренко¹, к. б. н., н. с., Е. И. Тихомирова³, д. б. н., профессор,
 Т. К. Антал^{1,2}, д. б. н., г. н. с.,
¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
 119991, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1,
²Псковский государственный университет,
 180000, Россия, г. Псков, площадь Ленина, д. 2,
³Саратовский государственный технический университет
 имени Гагарина Ю. А.,
 410054, Россия, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77,
 e-mail: taras_an@mail.ru, styx@biophys.msu.ru, tichomirova_ei@mail.ru

В настоящее время получают распространение методы выявления плохо формализуемых закономерностей в экспериментальных данных с помощью нейросетевых моделей. В данной работе разработан прототип нейросетевой модели для выявления действия тяжёлых металлов на фитопланктон по изменению формы индукционной кривой флуоресценции хлорофилла (ОИР кривой), которая может быть использована в автоматической системе биоиндикации состояния водоёмов. Предложенная модель апробирована на природном фитопланктоне из 9 водоёмов Псковской области, который подвергли долгосрочному воздействию солей кадмия и хрома (20 и 50 мкМ CdSO₄ и K₂Cr₂O₇) в лабораторных условиях. Модель позволяет выявить токсическое действие тяжёлых металлов с точностью до 90%, что указывает на перспективность применения данного подхода в экологическом мониторинге.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, водные экосистемы, фитопланктон, экологический мониторинг, нейронные сети, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез.

Heavy metal toxicity detection in phytoplankton by using neural network analysis of chlorophyll fluorescence induction

© 2021. S. S. Khruschev¹ ORCID: 0000-0002-4714-6221¹
 T. V. Drozdenko² ORCID: 0000-0002-5553-2296² T. Yu. Plyusnina¹ ORCID: 0000-0002-0734-1727¹
 I. V. Timofeev² ORCID: 0000-0002-5862-2203² D. A. Todorenko¹ ORCID: 0000-0002-7344-0256¹
 E. I. Tichomirova³ ORCID: 0000-0001-6030-7344³ T. K. Antal^{1,2} ORCID: 0000-0002-9690-8034^{1,2}
¹Lomonosov Moscow State University,
 GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991,
²Pskov State University,
 2, Lenina Square, Pskov, Russia, 180000,
³Yuri Gagarin State Technical University of Saratov,
 77, Politekhnicheskaya St., Saratov, Russia, 410054,
 e-mail: taras_an@mail.ru, styx@biophys.msu.ru, tichomirova_ei@mail.ru

Application of artificial neural networks for identifying poorly formalized patterns in experimental data become widespread nowadays. In the present work, we elaborated a prototype of a model for detection of water contamination by heavy metals. The model is a fully connected neural network (multilayer perceptron) designed by using the Python programming language and the TensorFlow software (Keras). It is intended for application in environmental monitoring of natural water bodies using chlorophyll fluorescence measurements which are considered as highly informative ap-

proach for probing photosynthetic activity *in vivo* and *in situ*. Fluorescence rise induced by application of a strong light pulse to the dark-adapted plant or algae (the OJIP transient) reflects a stepwise transition of the photosynthetic electron transport chain from the oxidized to the fully reduced state. To provide a quantitative analysis of the OJIP transient, a JIP test was introduced whose parameters describe energy fluxes through the photosynthetic electron transport chain. Our model uses OJIP transients and/or JIP-test parameters, measured in phytoplankton communities, as input data. As a result, it determines the probability of water pollution by heavy metals. In order to test the model, phytoplankton samples were taken from 9 water bodies of Pskov region and then treated with chromium and cadmium under laboratory conditions. For that, phytoplankton samples were exposed to cadmium and chromium salts (CdSO_4 and $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) at two concentrations (20 and 50 μM) for three days, and OJIP curves were recorded and JIP-test parameters calculated at different stages of the experiment. In total, 419 curves were collected, and a whole dataset was analyzed. Results showed that accuracy of detecting the toxic effects of Cd^{2+} (after 2 or more hours of incubation) and $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (after 9 or more hours of incubation) by the model achieved 90%. The highly accurate determination of the toxicity of heavy metals indicates a promising prospect for the application of machine learning technology in environmental monitoring.

Keywords: heavy metals, aquatic ecosystems, phytoplankton, environmental monitoring, neural networks, chlorophyll fluorescence, photosynthesis.

Тяжёлые металлы (ТМ) являются одними из распространённых загрязнителей водных экосистем и представляют серьёзную угрозу для живых организмов. Вместе со сточными водами ТМ попадают в водоёмы, вызывая интоксикацию фитопланктона, который является первичным продуцентом и определяет состояние водной экосистемы в целом. Основным механизмом токсического действия ТМ обусловлен ингибированием ключевых метаболических процессов и деления клеток в результате взаимодействия с SH-содержащими соединениями и дисульфидными группами белков [1].

Физиологическое состояние фитопланктона отражает активность фотосинтеза. Воздействие ТМ на процесс фотосинтеза сопровождается снижением светопоглощательной способности, активности фотосинтетического электронного транспорта и фотофосфорилирования, скорости фиксации CO_2 и выделения O_2 . Тяжёлые металлы действуют также на ультраструктуру хлоропластов и вызывают деградацию фотосинтетических пигментов [2, 3]. Все эти изменения в конечном итоге приводят к снижению первичной продукции водных экосистем.

В промышленных сточных водах часто выявляются такие ТМ, как кадмий и хром, которые являются опасными токсикантами [4]. Воздействуя на первичные реакции фотосинтеза, кадмий и хром ингибируют электронный транспорт в фотосистеме 2 (ФС2) на донорной и акцепторной сторонах, снижают активность фотосистемы 1 (ФС1) и межсистемный электронный транспорт, скорость фиксации CO_2 [5–7].

Для раннего выявления загрязнения водоёмов ТМ необходимо разработать высокоэффективные методы мониторинга водных экосистем. Флуоресценция хлорофилла может

использоваться в качестве чувствительного индикатора состояния первичных реакций фотосинтеза, связанных с поглощением и преобразованием энергии света фитопланктоном [8, 9]. Разработано несколько методов оценки состояния фотосинтеза *in situ* по параметрам флуоресценции хлорофилла [10], в том числе по форме индукционной кривой быстрой флуоресценции хлорофилла с высоким временным разрешением (так называемая OJIP кривая) [11]. OJIP кривая отражает индуцированный сильным светом рост интенсивности флуоресценции от минимального уровня (F_0 , O) до полностью восстановленного состояния (P) через основные промежуточные этапы J и I [12]. Начальная фаза OJ длительною 2–3 мс соответствует восстановлению акцепторной стороны ФС2, в то время как последующая фаза JIP (150–300 мс) отражает последовательное восстановление пула пластохинонов и ФС1. Форма OJIP кривой обнаружила высокую чувствительность к воздействию стрессовых факторов. Использование математических имитационных моделей [13] позволило выяснить, какие основные процессы соответствуют отдельным стадиям индукционной кривой, однако пока не существует модели, позволяющей однозначно интерпретировать изменения этой кривой.

Нейросетевые модели зарекомендовали себя в качестве эффективного инструмента для выявления неявных плохо формализуемых закономерностей в экспериментальных данных. В последние десятилетия было предпринято несколько попыток использовать искусственные нейронные сети (ИНС) для анализа OJIP кривых. Так, в работах [14–16] исследовано действие стрессовых факторов (засуха, недостаток минерального питания) на параметры флуоресценции хлорофилла для ряда сельскохозяйственных культур и разра-

ботаны нейросетевые модели, позволяющие идентифицировать фактор стресса по форме индукционной кривой.

Целью данной работы являлась разработка чувствительного метода анализа флуоресценции хлорофилла для выявления токсического действия тяжёлых металлов на природный пресноводный фитопланктон. В этой связи предложен и апробирован на обработанных солями кадмия и хрома образцах фитопланктона оригинальный метод анализа ОИР кривых с помощью ИНС.

Объекты и методы исследования

Отбор образцов фитопланктона. Исследования проводили осенью 2020 г. в разнотипных водоёмах Псковской области, в том числе, в озёрах (Псковско-Чудском, Тёплом, Калацком, Лесицком, Тиглицы), дельте р. Великой, р. Каменке и пруду р. Мирожки. Пробы фитопланктона объёмом 0,5 л для микроскопических исследований и 1–1,5 л для изучения фотосинтетической активности отбирали пластиковыми ёмкостями с поверхностного горизонта.

Обработка образцов фитопланктона. Образцы фитопланктона культивировали в колбах Эрленмейера объёмом 250 мл в люминестате при интенсивности света 50 мкмоль фотонов/(м²·с) с периодом освещения: 12 ч день; 12 ч ночь при температуре 20–22 °С. Для предотвращения оседания клеток и обогащения культуры углекислым газом содержимое колб периодически перемешивали.

В качестве токсикантов использовали соли кадмия (CdSO₄) и хрома (K₂Cr₂O₇). В каждую колбу вносили 200 мл образца фитопланктона и добавляли токсиканты в конечной концентрации 20 и 50 мкмоль/л. Обработанные образцы фитопланктона инкубировали в приведённых выше условиях в течение 3 сут.

Для исследования качественных и количественных характеристик фитопланктона пробы фиксировали 40% раствором формалина, затем концентрировали до 10 мл. Идентификацию микроводорослей производили с помощью микроскопа «Carl Zeiss Axio Lab A1» (Германия) и камеры Нажотта (0,05 мл); использовали определители, указанные в [17]. Численность клеток фитопланктона на 1 л пересчитывали по общеизвестной формуле. Для установления трофности водоёма вычисляли индекс трофности Миллиус [18]. Индекс сапробности рассчитывали по Пантле-Букк в модификации Сладечека [19].

Измерение ОИР кривых. Кинетику световой индукции флуоресценции хлорофилла (ОИР-кривые) регистрировали с помощью флуориметра «AquaPen-С AP-С 100» (Photon System Instruments, Brno, Чехия). Флуоресценцию индуцировали красным светом с длиной волны 630 нм в течение 2 с при плотности потока квантов 1000 мкмоль фотонов/(м²·с). Сигнал флуоресценции хлорофилла детектировался PIN-фотодиодом со светофильтром (667–750 нм) и максимальной чувствительностью в диапазоне флуоресценции хлорофилла *a*. Перед измерениями образцы фитопланктона адаптировали к темноте в течение 10 мин.

Анализ параметров флуоресценции хлорофилла с помощью нейронных сетей. Для выявления токсического действия солей ТМ на природный фитопланктон был создан ряд полносвязных нейросетевых моделей с прямой связью (многослойный персептрон) с использованием языка программирования Python и пакета TensorFlow (Keras). Во всех моделях выходной слой состоял из единственного нейрона с сигмоидной функцией активации, выход которого интерпретировался как предсказание наличия ($\geq 0,5$) или отсутствия ($< 0,5$) токсического действия.

В качестве входных данных модели использовали либо величины интенсивности флуоресценции в отдельные моменты времени (30 мкс – 2 с) после включения света (456 значений – модели типа «С»), либо 23 параметра так называемого ИР-теста [11], рассчитанных по индукционной кривой с помощью программного обеспечения, встроенного во флуориметр «AquaPen-С AP-С 100» (модели типа «J»). Исходные данные нормализовывали таким образом, чтобы среднее по выборке значение каждого параметра было равно 0, а дисперсия – 1. В качестве целевой функции при обучении моделей использовали перекрёстную энтропию между фактическим наличием токсического действия и предсказанием модели. Обучение моделей проводили стохастическим методом адаптивной оценки моментов (Adam) в течение 200 эпох пакетами по 10 образцов.

Оценку точности предсказаний модели проводили методом скользящего контроля, реализованным с использованием пакета scikit-learn. Весь набор данных разбивался на 10 выборок одинакового размера с одинаковым соотношением контрольных и подвергшихся токсическому воздействию образцов, после чего каждая из 10 выборок использовалась для определения точности предсказания модели,

для обучения которой использовали остальные 9 выборок. Полученные результаты усредняли.

Были исследованы модели с разным числом скрытых слоёв (от 0 до 2 слоёв с активацией типа RELU) и разным числом нейронов в скрытых слоях. Показано, что точность предсказания модели с одним скрытым слоем существенно выше по сравнению с моделью без скрытых слоёв, однако добавление дополнительных слоёв не увеличивает точность предсказания. Оптимальное число нейронов в скрытом слое было определено равным 8, использование меньшего числа нейронов приводило к уменьшению точности предсказания модели, в то время как использование большего – не увеличивало точность.

Результаты и обсуждение

Общая характеристика фитопланктона.

Максимальное видовое богатство фитопланктона наблюдалось в пруду р. Мирожки и в открытой части Тёплого озера: по 84 таксона рангом ниже рода, минимальное – в озере Каляцкое – 47 (табл. 1). Основу флористического комплекса в исследованных водных объектах составляли представители отделов Bacillariophyta, Chlorophyta и Cyanobacteria, кроме пруда р. Мирожки, где вместо циано-

бактерий в видовом отношении доминировали эвгленовые водоросли. Общая численность осеннего фитопланктона изменялась от 1,8 до 73,0 млн кл./л. Наибольший вклад в численность вносили цианобактерии, доля которых (по количеству клеток) составляла 10,7–91,0% в зависимости от водоёма. Общая биомасса фитопланктона лежала в пределах 0,3–3,1 г/м³. Основу биомассы составляли диатомовые водоросли – до 73,4%. Согласно индексам трофности Миллиус, воды дельты р. Великой и Чудского озера относились к олиготрофному типу, а воды остальных исследованных водоёмов – к мезотрофному (табл. 1). Индекс сапробности по Пантле-Букк колебался от 1,65 до 2,32, что указывает на III класс качества изучаемых акваторий (умеренно загрязнённые).

Начальные значения максимального квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС2 FV/FM во всех образцах фитопланктона были достаточно низкими (0,4–0,5, табл. 1) по сравнению со значениями, наблюдаемыми в оптимальных условиях роста (около 0,7). Это отражает низкую активность фитопланктона в период осенней депрессии. Частично низкие значения FV/FM могут быть обусловлены присутствием цианобактерий в образцах, доля которых в видовом составе составляла около 20%.

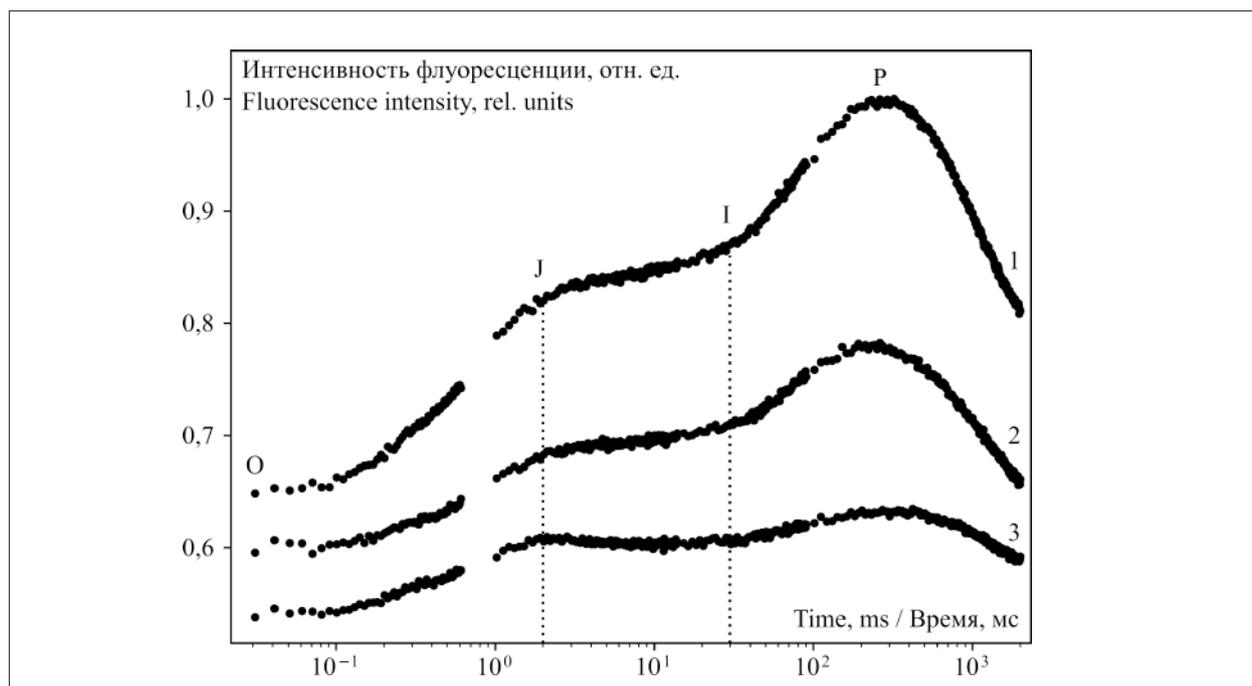


Рис. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла (OJIP кривые) в исследованных образцах фитопланктона. Показаны кривые, усреднённые по всем измерениям для всех исследованных проб при сроках инкубации от 9 до 71 ч в контроле (1), при действии CdSO₄ (2) и K₂Cr₂O₇ (3)

Fig. Induction curves of chlorophyll fluorescence (OJIP curves) of phytoplankton samples. Curves are averaged over all experiments for all samples: control (1), exposed to CdSO₄ (2), exposed to K₂Cr₂O₇ (3)

Таблица 1 / Table 1

Основные качественные и количественные характеристики фитопланктона и мест отбора проб
Key qualitative and quantitative characteristics of phytoplankton and sampling sites

Показатели Parameters	Пруд р. Мирожки Pond of the Mirozhka river	Дельта р. Великой Delta of the Velikaya river	Озеро Чудское Lake Chudskoe	Озеро Тёплое Lake Terploe	Озеро Калацкое Lake Kalatskoe	Озеро Лесицкое Lake Lesitskoe	Озеро Тиглицы Lake Tiglitsy
Общее число видовых таксонов фитопланктона, абс. The total number of species taxa of phytoplankton, abs.	84	46	64	84	47	72	65
Флористический комплекс Floristic complex	В-Chl-Eug	В-Chl-Cyan	В-Chl-Cyan	Chl-В-Cyan	Chl-В-Cyan	В-Chl-Cyan	Chl-В-Cyan
Общая N, млн кл./м ³ Total N, mln cells/m ³	1788,0	2322,9	2340,0	73040,0	5872,0	1990,0	24400,0
Общая В, г/м ³ / Total В, g/m ³	0,8	0,3	0,3	3,1	0,9	1,1	1,3
Индекс трофности Миллиуса Millius trophic index	42,4	32,7	32,7	56,3	43,8	45,8	47,5
Индекс сапробности по Пангле-Букк Pantle-Bukk saprobity index	2,13	2,32	2,17	1,90	1,65	1,99	1,92
F_v/F_m	0,440	0,525	0,341	0,433	0,389	0,376	0,417

Примечание: N – численность, В – биомасса; В-Chl-Eug – диатомово-хлорофитово-эвгленовый; В-Chl-Cyan – диатомово-хлорофитово-цианобактериальный; Chl-В-Cyan – хлорофитово-диатомово-цианобактериальный.

Note: N – number, В – biomass; В-Chl-Eug – diatom-chlorophytic-euglenic; В-Chl-Cyan – diatom-chlorophytic-cyanobacterial; Chl-В-Cyan – chlorophytic-diatom-cyanobacterial.

Таблица 2 / Table 2

Точность выявления токсического действия разных концентраций CdSO₄ и K₂Cr₂O₇ и отсутствия токсического действия в контроле для нейросетевых моделей
Precision of detecting toxic effects of different concentrations of CdSO₄ and K₂Cr₂O₇ and the absence of toxic effects in the control for neural network models

Токсикант Toxicant	Время инкубации, ч Incubation time, h	Концентрация токсиканта, мкМ Toxicant concentration, μM	Число измерений Number of measurements	Точность, % Precision, %			
				C1	C2	J1	J2
CdSO ₄	2–8	20	14	87	79	79	71
		50	14	93	79	93	100
	9–23	20	9	100	100	89	89
		50	9	100	100	89	89
	24–47	20	27	93	85	93	96
		50	28	93	86	79	82
	48–71	20	18	83	94	78	78
		50	17	88	82	88	88
K ₂ Cr ₂ O ₇	2–8	20	14	43	0*	64	14*
		50	14	64	0*	64	14*
	9–23	20	9	100	100	78	78
		50	9	100	100	100	100
	24–47	20	27	89	89	89	85
		50	27	100	100	100	96
	48–71	20	17	94	94	88	88
		50	16	100	100	94	100
Контроль Control	0–8	–	47	94	100	81	91
	9–23	–	17	82	94	71	94
	24–47	–	51	80	86	84	92
	48–71	–	35	66	71	71	83

Примечание: Данные сгруппированы по продолжительности инкубации проб с токсикантом. Приведено общее число экспериментов и доля правильных предсказаний нейросетевой модели при использовании плавающего контроля (перекрёстной проверки). * – Оценка получена с помощью модели, для обучения которой использовались все экспериментальные данные, кроме образцов, инкубированных с добавлением K₂Cr₂O₇ в течение 2–8 ч.

Note: The data are grouped according to the duration of incubation of samples with a toxicant. The total number of experiments and the proportion of correct predictions of the neural network model are shown using floating control (cross validation). * – The estimate was obtained using a model, which training was conducted excluding samples incubated with K₂Cr₂O₇ for 2–8 hours.

Анализ токсического воздействия кадмия и хрома на параметры флуоресценции фитопланктона. Усреднённые по всему эксперименту ОЛР кривые, соответствующие контрольным образцам фитопланктона и образцам, обработанным солями кадмия и хрома, приведены на рисунке. В контроле кривая характеризовалась двумя основными фазами индукции флуоресценции хлорофилла (ОJ и IP), в то время как фаза JI была в значительной степени подавлена, что отражает нарушение баланса между реакциями фотосинтетического электронного транспорта.

Такая форма кривой может отражать снижение активности ФС2 в период осенней депрессии фитопланктона, как упоминалось выше. Воздействие кадмия и хрома приводило

к снижению амплитуды максимальной переменной флуоресценции ОР и вклада фазы JIP в переменную флуоресценцию, что свидетельствует об уменьшении доли активных центров ФС2. Выявленное действие кадмия и хрома на ФС2 в образцах фитопланктона соответствует литературным данным [5, 20]. При этом воздействие хрома на параметры кривой было более выраженным по сравнению с кадмием, свидетельствуя о более сильном ингибиторном эффекте.

Для обучения нейросетевой модели из экспериментальных данных был сформирован набор, включающий 150 контрольных образцов со временем инкубации в колбах от 0 до 71 ч, и 269 образцов, инкубированных в присутствии токсикантов (CdSO₄ – 136, K₂Cr₂O₇ – 133) от 2 до 71 ч. Средняя точность выявления на-

личия либо отсутствия токсического действия ТМ составила $83,5 \pm 8,7\%$ для модели, использующей в качестве входных данных величины интенсивности флуоресценции (модель С1), и $86,9 \pm 7,1\%$ – для модели, использующей параметры JIP-теста (модель J1). В таблице 2 приведена точность выявления токсического действия в зависимости от вида токсиканта, его концентрации и продолжительности инкубации. Видно, что действие CdSO_4 эффективно выявляется уже после 2 ч инкубации, в то время как достоверное выявление токсического действия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ возможно только после инкубации продолжительностью 9 и более часов. Количество ложноположительных результатов для контрольных образцов возрастает с увеличением времени инкубации в колбах, что, вероятнее всего, связано с развитием у части образцов стресса, связанного с переносом из природной среды в лабораторные условия.

Исходя из полученных результатов, мы исключили из обучающего набора данных образцы, инкубированные с добавлением $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в течение 2–8 ч. Средняя точность выявления наличия либо отсутствия токсического действия ТМ для моделей, обученных с использованием этого набора, возросла и составила $89,5 \pm 4,3\%$ для модели, использующей величины интенсивности флуоресценции (модель С2), и $89,5 \pm 5,4\%$ – для модели, использующей параметры JIP-теста (модель J2). Это увеличение точности связано с уменьшением количества ошибок первого рода (ошибочного выявления токсического действия для контрольных образцов), и оно сопровождается снижением чувствительности моделей при выявлении действия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ на начальных стадиях.

Точность моделей С2 и J2 одинакова, однако распределение ошибок для них несколько различается. Доля ошибок второго рода (то есть ошибочного невыявления токсического действия) для моделей типа «С» несколько меньше, чем для моделей типа «J». Это может быть связано с тем, что при расчёте параметров JIP-теста происходит частичная потеря информации о форме индукционной кривой, в результате чего специфичность модели к выявлению токсического стресса на фоне проявлений действия стрессовых факторов иной природы может снижаться. Однако число обучаемых параметров в модели типа «J» значительно меньше по сравнению с типом «С» (225 против 3665), поэтому для обучения модели типа «J» требуется значительно меньшая обучающая выборка.

Заключение

Разработан прототип нейросетевой модели, предназначенной для выявления токсического стресса в клетках фитопланктона по параметрам индукционной кривой флуоресценции хлорофилла. Для обучения модели использованы экспериментальные данные по действию солей кадмия и хрома на природный фитопланктон из 9 водоёмов Псковской области. Созданная модель позволяет выявить токсическое действие ТМ с точностью около 90%, что показывает перспективность её использования в системе экологического мониторинга. По мере накопления экспериментальных данных по действию различных неблагоприятных факторов на природный фитопланктон предполагается дальнейшее совершенствование данного метода и создание на его базе автоматизированной автономной системы для раннего обнаружения токсического загрязнения природных вод.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500060-0 при частичной поддержке гранта РФФ № 20-64-46018 (Псковский государственный университет).

References

1. Van Assche F., Clijsters H. Multiple effects of heavy metal toxicity on photosynthesis // Effects of stress on photosynthesis / Eds. R. Marcelle, H. Clijsters, M. van Poucke. The Hague: Nijhoff/Junk. 1983. P. 371–382. doi: 10.1007/978-94-009-6813-4_39
2. Giloni-Lima P.C., Delello D., Cremonez M.L., Éler M.N., Lima V.A., Espindola E.L. A study of the effects of chromium exposure on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak evaluated by central composite design and response surface methodology // Ecotoxicology. 2010. V. 19. P. 1095–1101. doi: 10.1007/s10646-010-0491-2
3. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Environmental Chemistry Letters. 2010. V. 8. P. 199–216. doi: 10.1007/s10311-010-0297-8
4. Sall M.L., Diaw A.K.D., Gningue-Sall D., Aaron S.E., Aaron J-J. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review // Environmental Science and Pollution Research. 2020. V. 27. P. 29927–29942. doi: 10.1007/s11356-020-09354-3
5. Appenroth K.J., Stöckel J., Srivastava A., Strasser R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrrhiza* as probed by OJIP chlorophyll

- a* fluorescence measurements // Environmental Pollution. 2001. V. 115. P. 49–64. doi: 10.1016/s0269-7491(01)00091-4
6. Wang S., Zhang D., Pan X. Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow // Chemosphere. 2013. V. 93. No. 2. P. 230–237. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.070
7. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I., Kukarskikh G., Matorin D., Antal T. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.) // Planta. 2020. V. 251. No. 11. doi: 10.1007/s00425-019-03304-1
8. Kalaji H.M., Goltsev V.N., Žuk-Gołaszewska K., Živčák M., Brestic M. Chlorophyll fluorescence: understanding crop performance-basics and applications. Boca Raton: CRC Press, 2017. 236 p. doi: 10.1201/9781315153605
9. Kalaji H.M., Rastogi A., Živčák M., Brestic M., Daszkowska-Golec A., Sitko K., Alsharafa K.Y., Lotfi R., Stypiński P., Samborska I.A., Cetner M.D. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors // Photosynthetica. 2018. V. 56. P. 953–961. doi: 10.1007/s11099-018-0766-z
10. Matorin D.N., Rubin A.B. Chlorophyll fluorescence of higher plants and algae. Moskva–Izhevsk: Institut kompyuternykh issledovaniy, 2012. 256 p. (in Russian).
11. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series / Eds. G.C. Papageorgiou, Govindjee. Rotterdam: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 321–362.
12. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // Journal of Photochemistry and Photobiology. 2011. V. 104. P. 236–257. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010
13. Riznichenko G.Yu., Belyaeva N.E., Dyakonova A.N., Kovalenko I.B., Maslakov A.S., Antal T.K., Goryachev S.N., Plyusnina T.Yu., Fedorov V.A., Khrushchev S.S., Rubin A.B. Photosynthetic electron transport models // Biofizika. 2020. V. 65. No. 5. P. 886–902 (in Russian). doi: 10.31857/S0006302920050063
14. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Kouzmanova M., Kalaji H.M., Yordanov I., Krasteva V., Alexandrov V., Stefanov D., Allakhverdiev S.I., Strasser R.J. Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 2012. V. 1817. No. 8. P. 1490–1498. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.04.018
15. Kalaji M.H., Bąba W., Gediga K., Goltsev V., Samborska I.A., Cetner M., Dimitrova S., Piszcz U., Bielecki K., Karmowska K., Dankov K., Kompała-Bąba A. Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants // Photosynthesis Research. 2018. V. 136. No. 3. P. 329–343. doi: 10.1007/s11120-017-0467-7
16. Aleksandrov V. Identification of nutrient deficiency in bean plants by prompt chlorophyll fluorescence measurements and Artificial Neural Networks // BioRxiv preprint. 2019. doi: 10.1101/664235
17. Drozdenko T.V. Phytoplankton as an indicator of the ecological state of a reservoir (for example, Lake Barskoye, Pskov region) // Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya. Khimiya. Biologiya. Ekologiya. 2018. V. 18. No. 2. P. 225–231 (in Russian). doi: 10.18500/1816-9775-2018-18-2-225-231
18. Smirnov N.P. Theoretical questions of the lakes classification. Sankt-Peterburg: Nauka, 1993. 185 p. (in Russian).
19. Sládeček V. System of water quality. Stuttgart: Archiv für Hydrobiologie–Beiheft: Ergebnisse der Limnologie 7, 1973. 218 p. doi: 10.1002/aheh.19750030112
20. Perreault F., Dionne J., Didur O., Juneau P., Popovic R. Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II // Photosynthesis Research. 2010. V. 107. No. 2. P. 151–157. doi: 10.1007/s11120-010-9609-x